

PENGARUH LAJU AERASI TERHADAP PRODUKSI KITINASE OLEH *Trichoderma asperellum* TNJ63

Riko Naldo Saputra¹, Sri Helianty², Sri Rezeki Muria²

¹Mahasiswa Jurusan Teknik Kimia S1, ²Dosen Jurusan Teknik Kimia,
Fakultas Teknik, Universitas Riau
Kampus Binawidya Km 12,5 Simpang Baru Panam, Pekanbaru 28293
E-mail: rikonaldosaputra@gmail.com

ABSTRACT

Chitinase is enzyme that hydrolyze chitin compound in β -1,4-N-acetyl-glucosamine into monomer N-acetyl-glucosamine, which widely occurs in nature. This enzyme is potentially applicable in the field of pharmaceuticals for the treatment of cancer, tuberculosis, asthma, diabetes, allergies and infections. Chitinase can be produced by microorganisms chitinolytic are numerous in the biosphere, one of the local isolates Trichoderma asperellum TNJ63. In this research, scale up production of 25 mL to 1.5 L medium. Fermentation was carried out in a 2 L stirred tank bioreactor using methods submerged fermentation (SmF) with the substrate chitin from shrimp shells. Chitinase production conducted for 9 days with stirring speed of 40-60 rpm, and the effect of aeration rates (0 vvm; 0.5 vvm; 1 vvm and 1.5 vvm) studied the chitinase activity produced. The highest chitinase activity was obtained at 1 vvm aeration rate and fermentation time of 7 days with 0.0160 U / mL through analysis UV-Vis spectrophotometer with a sugar analysis method, Nelson-Somogyi.

Keywords: aeration, chitinase, scale up, shrimp shells, *Trichoderma asperellum* TNJ63

1. PENDAHULUAN

Kitinase (EC 3.2.2.14) adalah glikosil hidrolase, yang berfungsi untuk menghidrolisis β -1,4 dari N-asetilglukosamin yang terdapat dalam rantai kitin yang berukuran antara 20-90 kDa [Bhattacharya dkk., 2007]. Kitinase dan hasil hidrolisisnya banyak dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi pertanian, lingkungan, dan kesehatan [Muzarelli dan Peter, 1997]. Kitinase dalam bidang kesehatan dapat digunakan sebagai agen anti jamur di dalam obat untuk pengobatan infeksi [Oranusi dan Trinci, 1985]. Produk turunan kitin seperti kitoolisakarida memiliki aktivitas antitumor sehingga dapat digunakan untuk pengobatan kanker, penyembuhan luka, dan antihipertensi

[Park dkk., 2000]. Karboksimetil kitin dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan benang operasi, dan N-Asetil-D-glukosamin dapat dimanfaatkan sebagai obat untuk mengontrol kadar gula dalam darah, obat asma, sebagai suplemen, antiinflamasi, dan pengobatan *osteoarthritis* [Sashiwa dkk., 2002].

Kitinase dapat dihasilkan oleh mikroorganisme kitinolitik yang banyak terdapat di lingkungan biosfer, salah satunya isolat lokal *Trichoderma asperellum* TNJ63 yang diisolasi dari tanah perkebunan jeruk di Riau [Nugroho dkk., 2003]. Nugroho dkk. [2009] telah berhasil memproduksi kitinase *T. asperellum* TNJ63 di dalam labu goyang (*shake flask*) 50 mL dengan volume kerja 25 mL, dengan

mempelajari waktu, pH, dan jenis sumber kitin yang optimal terhadap produksi kitinase. Waktu dan pH pertumbuhan optimal *T. asperellum* TNJ63 menghasilkan kitinase yaitu selama 7 hari dengan pH 5,5. Sumber kitin yang berasal dari limbah cangkang udang laut atau udang sungai tidak menghasilkan perbedaan yang nyata terhadap aktivitas kitinase yang dihasilkan.

Produksi kitinase penelitian ini mengacu pada kerja Nugroho dkk. [2009], penelitian ini merupakan pembesaran skala volume kerja menjadi 1,5 L atau 60 kali pembesaran volume acuan yang dilaksanakan di dalam bioreaktor berpengaduk 2 L. Pembesaran skala ini mestilah mampu mempertahankan proses biokimia berlangsung sedekat mungkin dengan kondisi skala laboratorium sebagai tolak ukur peristiwa biokimia tidak dikendalikan oleh peristiwa fisika, seperti pengadukan, perpindahan massa dan aerasi.

Pengadukan berperan penting dalam perpindahan massa. Laju pengadukan berperan menentukan pola kelangsungan hidup jamur dan pertumbuhan fermentasi, namun juga perlu mempertimbangkan pembentukan metabolit selama fermentasi. Untuk metabolit yang bersifat katalitik seperti enzim, pada laju pengadukan tertentu dapat menimbulkan kerusakan pada enzim [Suraini dkk., 2008]. Selain pengadukan, keberadaan oksigen juga berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme yang bersifat aerobik karena berfungsi sebagai substrat untuk pembangkit energi. Ketegangan *dissolved oxygen* (DO) dapat mempengaruhi produktivitas, autolisis sel, morfologi jamur, dan lain-lain [Cui dkk., 1998]. Namun, selama fermentasi berlangsung keterbatasan kelarutan dan tahanan perpindahan massa volumetrik oksigen sering menjadi komponen pembatas dalam

media fermentor [Shuler dan Kargi., 2002]. Pemberian oksigen selama fermentasi biasanya dilakukan dengan mengalirkan udara melalui *sparger* ke dalam bioreaktor menggunakan pompa udara. Pendistribusian gas ke bioreaktor menggunakan *sparger* berfungsi mendispersikan gas menjadi gelembung udara berukuran kecil agar penyebaran gas merata ke seluruh bioreaktor dan meningkatkan kontak antara oksigen terhadap larutan media. Adapun dalam penelitian ini dilakukan peninjauan pengaruh variasi laju aerasi 0; 0,5; 1; dan 1,5 vvm terhadap produksi kitinase yang dihasilkan oleh *T. asperellum* TNJ63.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Bahan dan Alat

2.1.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat jamur lokal *Trichoderma asperellum* TNJ63 yang dipasok dari Laboratorium Biokimia FMIPA UR, kitin dari limbah cangkang udang industri ebi Kabupaten Indragiri Hilir, KNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, udara, Dapar Sitrat-Fosfat, Dapar Asetat, Reagen Nelson Somogyi dan Aquades.

2.1.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu bioreaktor 2 liter (Pyrex), *autoclave* (LDZX-50FA, China), motor pengaduk (Heidolph, Type RZR1), pompa udara AA-350 (Amara, China), rotameter, *shaker*, pH meter (ATC pH-2011), ayakan 80 *mesh*, erlenmeyer, spektrofotometer UV-Vis 1240 keluaran Shimadzu, Japan (No. Seri 04020), *Corning syringe filter* 0,45 µm PES filter media (No. Katalog 6780-2504), alat sentrifugal, kertas saring *GF/C* whatman (No. Katalog 1822055) dan peralatan laboratorium standar sesuai prosedur.

Variabel Penelitian terdiri dari variabel tetap dan variabel berubah. Variabel tetap pada penelitian ini yaitu berat cangkang udang, berat nutrisi, laju pengadukan, pH 5.5 [Nugroho *et al.*, 2009] dan konsentrasi starter 10% [Shuler dan Kargi, 2002], serta ukuran partikel cangkang udang melewati saringan 80 mesh [Suraini *et al.*, 2007].

Variabel berubah pada penelitian ini adalah variasi laju aerasi (0 vvm, 0.5 vvm, 1 vvm, dan 1,5 vvm) dan waktu fermentasi (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 hari)

2.2 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan dalam pengerjaannya, yakni dimulai dengan persiapan bahan dan alat, preparasi bahan, penyegaran isolat, pembuatan starter, proses fermentasi, pemurnian enzim kitinase, uji aktifitas kitinase dan terakhir analisis data.

2.2.1 Tahap Persiapan

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini berupa cangkang udang lokal, yang dicuci dengan air bersih, dikeringkan, lalu dihaluskan dan kemudian diayak menggunakan ayakan 80 mesh.

Medium fermentasi yang digunakan berupa substrat kitin dengan komposisi medium cair di dalam bioreaktor 2 L terlihat pada tabel 2.1

Tabel 2.1 Komposisi Medium

Susunan Nutrisi	Berat atau Volume
KNO ₃	15 g
KH ₂ PO ₄	7,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,75 g
Cangkang udang	16,04 g
Dapar Sitrat Fosfat	1,5 L

Untuk proses analisa diperlukan substrat yang nantinya akan dikonversi menjadi glukosa oleh enzim kitinase,

substrat yang digunakan adalah kitin dari cangkang udang yang telah di *treatment* menjadi larutan koloidal kitin 2 %.

Jamur yang digunakan terlebih dahulu diremajakan, proses peremajaan jamur pada penelitian ini dibantu oleh staff teknisi lab Biokimia FMIPA Universitas Riau. Jamur-jamur ditanam pada medium padat (PDA) agar miring, selama 4-5 hari yang ada kitin 1 % sebagai sumber karbon. Jamur diambil secara aseptik menggunakan jarum ose dari permukaan plat agar dan disuspensikan dalam media cair yang steril, ini sebagai starter

2.2.2 Tahap Sterilisasi

Alat-alat yang akan digunakan pada proses pembuatan medium dan proses fermentasi harus disterilisasi terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya kontaminasi yang dapat mempengaruhi hasil fermentasi. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan menggunakan *autoclave*.

2.2.3 Tahap Penelitian

a. Pembuatan starter

Pembuatan starter dilakukan dengan menginokulasikan jamur dari media agar miring secara aseptik ke dalam erlenmeyer berisi 150 mL media produksi enzim, komposisi media starter 10 % dari media produksi [Shuler dan Kargi, 2002], yang telah disterilisasi menggunakan *autoclave* dan selanjutnya didinginkan hingga sama dengan suhu ruang. Starter tersebut kemudian diinkubasi selama 5 hari dan diaduk menggunakan *shaker* pada kecepatan 150 rpm pada suhu ruang, setelah masa inkubasi selesai, starter siap diinokulasikan ke dalam bioreaktor.

b. Tahap Fermentasi

Media fermentasi beserta nutrisinya dimasukkan ke dalam bioreaktor 2 liter dan

disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121° C selama 15 menit lalu didinginkan hingga sama dengan suhu ruang. Medium siap diinokulasi dengan suspensi spora *T. asperellum* TNJ63 (150 ml starter yang telah selesai diinkubasi), kemudian dilakukan setting pengaduk dan laju aerasi sesuai variasi (0,5; 1; 1,5vvm dan tanpa aerasi). Fermentasi dilakukan secara batch dengan suhu ruang, selama 9 hari. Pada setiap hari dilakukan pengambilan sampel dan isolasi ekstrak kasar enzim.

c. Isolasi ekstrak kasar enzim

Media produksi enzim hasil fermentasi didinginkan dalam lemari pendingin bersuhu 5° C selama 1 jam. Media dingin ini kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan sisa substrat padat dan biomassa *T. Asperellum*. Partikel sisa dipisahkan dari filtrat dengan penyaringan melalui kertas saring GF/C whatman dan selanjutnya menggunakan *corning syringe filter* 0,45 µm. Filtrat yang diperoleh didinginkan lagi (-5° C) selama 1 jam, filtrat steril berupa ekstrak kasar enzim ditambahkan 0,02% NaN₃ sehingga enzim dapat disimpan pada lemari pendingin selama 2 minggu. Ekstrak kasar enzim selanjutnya akan ditentukan aktivitas kitinasenya sebagai ukuran produksi kitinase per liter media produksi.

d. Uji aktivitas kitinase *Trichoderma asperellum* TNJ63

Aktivitas kitinase ditentukan berdasarkan jumlah produksi gula pereduksi yang dibebaskan per menit per ml ekstrak enzim dengan kitin 2% sebagai substrat.. Sebagai standar dibuat larutan glukosa berbagai konsentrasi antara 0,01-0,1 mg/ml dengan metode Nelson-Somogyi. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer pada λ 527 nm.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Pengaruh Laju Aerasi

Oksigen merupakan substrat terpenting dalam fermentasi aerob sebagai substrat pembangkit energi untuk pertumbuhan jamur, dan sering menjadi substrat pembatas karena tingkat kelarutannya yang rendah dalam media fermentasi [Shuler dan Kargi, 2002]. Penentuan tingkat produksi enzim kitinase dilakukan dengan mengukur aktivitas enzimatisnya, yaitu kemampuan kitinase dalam mengubah substrat kitin menjadi glukosa.

Aktivitas ekstrak kasar kitinase yang dihasilkan *T. asperellum* TNJ63 pada setiap variasi laju aerasi yang digunakan cenderung meningkat sampai hari ke 7 hingga pada hari ke 8 dan 9 terjadi penurunan aktivitas kitinase. Kurva aktifitas enzim yang dihasilkan identik dengan kurva pertumbuhan jamur, dimana pada awalnya jamur akan beradaptasi di dalam medium, lalu jamur akan terus tumbuh hingga pada akhirnya akan mengalami fase kematian atau berkurangnya populasi dikarenakan sumber karbon dari kitin yang merupakan sumber makanan utama tidak lagi mencukupi dan semakin berkurang [Ahmad, 2009].

Aktifitas kitinase tertinggi didapatkan pada laju aerasi 1 vvm, dengan aktifitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan dengan laju aerasi lainnya, mulai dari hari pertama hingga hari terakhir fermentasi. Aktifitas kitinase tertinggi diperoleh dengan lama waktu fermentasi 7 hari, dengan aktifitas enzim kitinase mencapai 0,0160 U/ml.

4. KESIMPULAN

Laju aerasi berpengaruh terhadap tingkat produksi kitinase yang dihasilkan oleh *T. asperellum* TNJ63. Kitinase tertinggi penelitian ini dihasilkan pada laju

aerasi 1 vvm dan lama fermentasi 7 hari dengan aktivitas enzim yang dihasilkan 0,0160 U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A. (2009). *Teknologi Fermentasi*. Jurusan Teknik Kimia Universitas Riau: Pekanbaru.
- Bhattacharya, D., A. Nagpure., dan R.K. Gupta. 2007. Bacterial Chitinases: Properties and Potential. *Critical Reviews in Biotechnology*.27: 21-28.
- Nugroho, T. T., C. Ginting., M. Ali., Wahyuningsih, A. Dahliaty., S. Devi., dan Y. Sukmarisa. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Sebagian Kitinase *Trichoderma viride* TNJ63. *Jurnal Natur Indonesia*. 5(2): 101-106.
- Nugroho, T.T., Y. Nurulita., dan S. Devi. 2009. Produksi Kitinase *Trichoderma asprellum* TNC52 dan TNJ63 Galur Lokal Riau Menggunakan Limbah Kulit Udang. *Laporan Penelitian Unggulan Lokal*. Pekanbaru: Lembaga Penelitian Universitas Riau.
- Oranusi, N.A. dan A.P.J. Trinci. 1985. Growth of bacteria on chitin, fungal cell walls and fungal biomass, and the effect of extracellular enzymes produced by these cultures on the antifungal activity of amphotericin B. *Microbios*. 43(172): 17-30.
- Park, S.H., J.H Lee, dan H.K Lee. 2000. Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio sp.* 98CJ11027. *J. Microbiol*. 38(4): 224–229.
- Sashiwa H., S. Fujishima., N. Yamano., N. Kawasaki., A. Nakayam., E. Muraki., K. Hiraga., K. Oda., dan S. Aiba. 2002. Production of N-acetyl-D-glucosamine from co-chitin by Crude Enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Carbohydrate Research*.337: 761-763.
- Shuler, M. L. dan F. Kargi. 2002. *Bioprocess engineering basic concepts*. 2nd ed. USA: Prentice Hall.
- Suraini, A.A., C.F. Christine., M.S. Madihah., M.I. Rosli., dan M.H. Ali. 2008. Effect of Agitation and Aeration Rates on Chitinase Production Using *Trichoderma virens* UKM1 in 2-l Stirred Tank Reactor. *Appl Biochem Biotechnol*. 150: 193-204.